

〔原 著〕

モルモット気道アレルギーにおける組織学的検討

I. 同種抗体受身感作モデルにおける単回抗原暴露後の

好酸球浸潤と気道形態変化

獨協医科大学アレルギー内科

湯川龍雄 寺師義典 福田 健 牧野荘平

昭和大学医学部第一病理

細野克彦 副島和彦

同種抗 OA 血清を用いてモルモットを受身感作し、抗原吸入暴露後の気管支好酸球浸潤と形態学的変化について経時的に検討した。

抗原暴露後、ほぼ6時間目をピークに気管支の subepithelium, epithelium 領域に著しい好酸球浸潤が認められた。気管支内に浸潤した好酸球の超微細構造を経時的に検討していくと、抗原暴露6時間目前後より細胞質の空胞化が観察され、更に時間の経過とともに特異顆粒の core の融解、matrix 構造の崩壊から、最終的には好酸球細胞全体の崩壊へとつながる一連の変化が観察された。気管支粘膜上皮の超微細観察では、抗原暴露前に比較し、好酸球特異顆粒に著しい変化が認められた抗原暴露24時間目以後より cilia の破壊性変化が認められ、好酸球浸潤との関連が示唆された。

これらは、気管支喘息における好酸球の役割を検討する上で極めて興味深い結果であり、気道の炎症、遅発型反応の機序を究明する気道アレルギー実験として有用であると考えた。

Key words: anti-ovalbumin serum — bronchial epithelial damage — eosinophilic infiltration — passively sensitized model — single inhaled antigen challenge

緒 言

気管支喘息の特徴的な病理組織学所見の1つは、気管支壁及び気道内粘液物への好酸球浸潤であり、喘息死肺^{1)~5)}及び肺生検組織^{5)~7)}で示されている。このことは、喘息患者の気管支肺胞洗浄(以下 BAL)液中の細胞成分にも反映され、他の肺疾患に比較し好酸球の割合が有意に高い⁸⁾⁹⁾ことで示され、更に発作とも密接な

関連のあることが剖検例(発作・窒息死した例では好酸球浸潤は著しく、非発作時の死亡では認められない³⁾⁴⁾)、気管支生検例(発作後まもない時期では好酸球浸潤を認めるが、寛解時では認められない⁶⁾)で示されている。

しかし、このように気管支喘息と気道内好酸球浸潤との関連性、重要性については、以前より言及されてきたにもかかわらず、これまでに、好酸球を中心にした I 型アレルギー反応後の経時的かつ詳細な肺組織所見の検討は殆んど行われていない。

今回、我々は、I 型アレルギー反応における好酸球の気道浸潤の役割と意義、更に最近注目されている遅発型反応(以下 LAR)との関連を追究するための第一歩として、同種抗 ovalbumin(以下 OA)血清による受身感作モルモットを用いて、抗原吸入暴露後の肺組織における好酸球浸潤の変化を経時的に検討したので、若干の考察を加え報告する。

Received: February 27, 1987

Accepted: April 4, 1987

Abbreviations: AES anti-eosinophil serum; ASB arylsulfatase B; BAL bronchial alveolar lavage; ECP eosinophil cationic protein; EDI eosinophil-derived inhibitor; EPO eosinophil peroxidase; LAR late asthmatic response; LT leukotriene; MBP major basic protein; OA ovalbumin; PAF platelet-activating factor; PCA passive cutaneous anaphylaxis; SEM scanning electron microscopy; TEM transmission electron microscopy

方 法

1. 感作モルモットの作成

Fig. 1 に感作モルモットの作成方法をシェーマとして示す。体重約300gのHartley系雄モルモット(ドーケンより購入)を、既に我々が発表した方法¹⁰⁾に従って、ovalbumin (Sigma Grade V, 以下OA)で感作した。すなわち、OA 1 μ gを5mgのAl(OH)₃(和光純薬工業製)とともに、月1回モルモット腹腔内に注射し、3回感作、1週後に耳朶採血し、48時間PCA titer 640倍以上のモルモットから全採血し、血清分離後はほぼ同量ずつを一同に混合し-80℃に保存した。この凍結保存した血清の4時間PCA titerは640倍、7日間PCA titerは非熱処理が1280倍、56℃4時間熱処理が20倍以下であった。PCA反応は、Ovaryの方法¹¹⁾に従い、感作モルモット血清の希釈系列を体重約250gの未感作モルモットの背部皮膚に各0.1ml皮内注射し、各々一定の感作期間後に、OA 500 μ gと1% Evans blue液1mlを静注し、30分後に直径8mm以上青色化したものを陽性として判定した。

次に、こうして得られた同種抗OA血清を、体重約400gのHartley系雄モルモットに2ml/kg静脈内投与し受身感作し、その48時間後にOA吸入暴露し、アナフィラキシー反応後の肺組織所見について経時的に

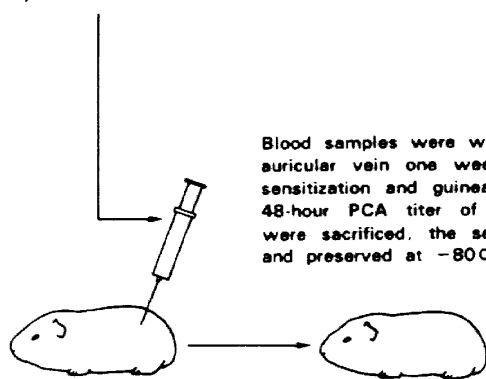
検討した。

2. 抗原吸入暴露

抗原吸入方法は、Fig. 2に示すように、6l/minの気流量にてDevilbiss 646ネブライザーで2mg/mlのOAをanimal chamber box(プラスチック製、円筒部位の内径10cm、長さ17cm、壁の厚さ0.5cm)で1分間吸入させ、その後のbox内圧の変化をpressure transducer (Validyne Engineering Corp. Model MP 45-18)によって取り出し増幅器(シズメメディカル社製)を通してoscilloscope(三栄測器製2G46)に描き出し、経時的にpolygraph(三栄測器製Surgical Monitor 125)に記録し、全例に強度の発作が出現したことを確認した。

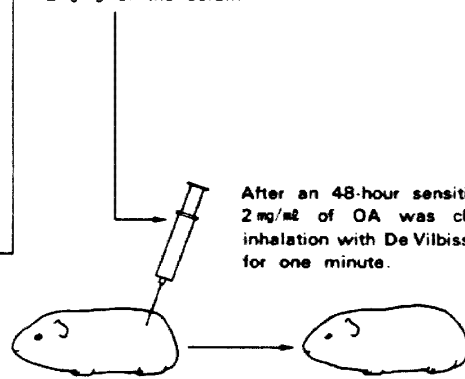
また、一部、同様の抗原吸入暴露による呼吸抵抗の変化をMeadら¹²⁾のoscillation法を一部改変して観察した。すなわち、モルモットの頭部を外に突出させて固定でき、頸部以下を密閉させたchamber box(プラスチック製、円筒部位の内径10cm、長さ18cm、壁の厚さ0.5cm、モルモットの頸部固定部位は、ゴム製のドーナツ状balloonで作製され密閉可能)内で、モルモットの後部より18Hz前後のSine wave (Leader Electronics Corp. Model LFG-1300 function oscillatorにTRIO integrated power amplifier, Model KA-900を通してCoral Corp. Model 12L-70, woofer speakerに

Male Hartley guinea pigs (about 300g) were sensitized three times by intraperitoneal injection of 1 μ g OA with 5 mg Al(OH)₃ at monthly intervals.



Blood samples were withdrawn from the auricular vein one week after the final sensitization and guinea pigs showing a 48-hour PCA titer of 1:640 or more were sacrificed, the sera were obtained and preserved at -80°C.

Male Hartley guinea pigs (about 400g) were passively sensitized by intravenous injection of 2 mg/kg of the serum.



After an 48-hour sensitization period, 2 mg/ml of OA was challenged by inhalation with De Vilbiss 646 nebulizer for one minute.

After anaphylaxis, the guinea pigs were sacrificed and blood samples and the lungs for microscopic examination were obtained.

Fig. 1. Schematic illustration of experimental design to study the influence of allergen-induced anaphylaxis on lung pathological findings.

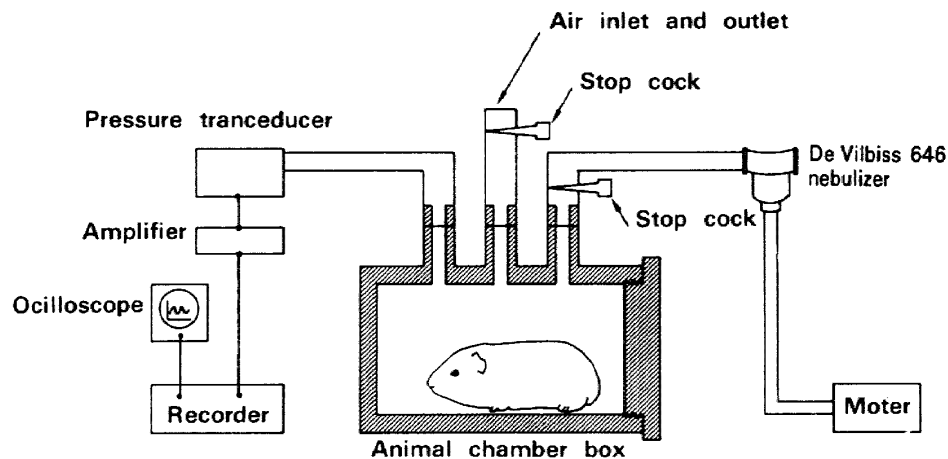


Fig. 2. Schematic illustration of the experimental apparatus for recording changes of the pressure in the chamber box housing guinea pigs.

接続し、Sine 波を発生)の圧力波を加えた。一方、モルモットの呼吸流量を、円錐形プラスチックマスク(円錐の先端に8mm 径の穴をあけ、200mesh の鋼製スクリーンを設置)のスクリーンを通して、differential transducer (Validyne Engineering Corp. Model MP45-18)によって取り出し、増幅器(シズメメディカル社製)を通して oscilloscope (三栄測器製 2G46)に描き出し、polygraph(三栄測器製 Surgical Monitor 125)に記録し、chamber box 内圧と呼吸流量の比より測定した。

3. 光学顕微鏡的観察

得られた肺切除標本は、ホルマリン固定し、パラフィン包埋後2 μ に薄切し、H-E, Giemsa, Hansel, Toluidine blue, Azan-Mallory の各染色を行い、各種炎症性細胞の同定、後述する面積を求める際の各領域の正確な観察のため応用した。

抗原暴露前後での炎症性細胞の推移は、Walter らの報告¹³⁾に準じて、顕微鏡とテレビ画像を直結した画像解析装置上で、manual-digitized 処理を行い、それをコンピューター (NEC 2次元デジタル化プログラム)に入れ面積を求め、その面積内に存在する各種細胞を1mm²あたりの絶対数に換算し、定量的に表示した。

観察した部位は、気管から肺胞に至るまでの全領域であるが、今回は、便宜的に気管支を3つの大きさに分け検討した。すなわち、その全周に気管支軟骨が認められ直径0.5mm 以上の large bronchus、直径約0.2 mm で気管支周囲に軟骨が散在する intermediate bronchus、更に直径約0.1mm、周囲に気管支軟骨はなく筋層の乏しい small bronchus の3種類の大きさの気管支について、更に各々の気管支を epithelium と

subepithelium に分けて検討した。

4. 電子顕微鏡的観察

肺切除標本の一部は、同様の時間的経過で電子顕微鏡用観察のため処理した。すなわち、まず透過型電子顕微鏡(以下 TEM)用標本として、冷2% glutaraldehyde (0.05M cacodylate buffer pH 7.3)の前固定を行ったのち、1% osmium tetroxide (PBS pH 7.3)の後固定を行い、alcohol 系列で脱水後、Epon 812に包埋した。次に、LKB 4800 ultramicrotome で超薄切片を作成し、uranyl acetate と lead citrate で二重染色し、日本電子 JEM-100B 型電子顕微鏡(加速電圧80 KV)で観察した。

また、走査型電子顕微鏡(以下 SEM)用標本は、同様にして得られた肺資料を2% glutaraldehyde (0.05 M cacodylate buffer pH 7.3)で固定後、ethanol で脱水し amylacetate 処置後、液体炭酸ガスで臨界点乾燥を行い、Au-Pd のイオンスパッタリングをし、日立走査型電子顕微鏡 S-650 (加速電圧15KV)にて観察した。

5. 統計:

実験データは、全て mean $\pm$ SEM で表現し、各時間経過ごとの動物匹数(n)は、6-12である。有意差の検定は、Student's test を用い、P value は<.05を有意と考えた。

結 果

1. 抗原暴露後の気道反応

animal chamber box 内圧の変化でとらえた典型的

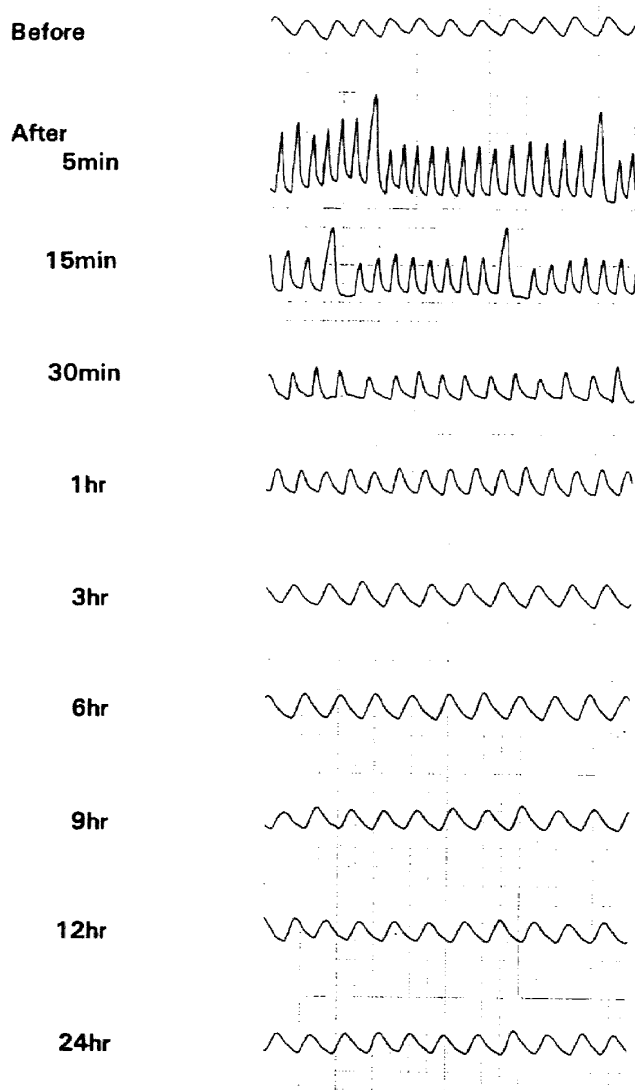


Fig. 3. Serial changes of pressure in the box after challenge with OA inhalation in a passively sensitized guinea pig.

な発作の1例をFig. 3に示す。OA吸入前に比較し、抗原暴露5分後で著しい呼気の延長と強度の発作が認められ、吸入後15分前後まで続き、約1時間後には発作は全例殆ど消失した。

Meadらに準じて測定した oscillation 法による呼吸抵抗でも、Fig. 4に示すように、抗原吸入暴露前が 0.324 ± 0.019 、暴露後が $0.847 \pm 0.063 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ と baseline 値の2倍以上の有意な増加が認められ、1時間後には $0.385 \pm 0.017 \text{ cm H}_2\text{O/ml/sec}$ と低下し、発作の軽快したことが確認された。なお、box内圧の経時の変化及び呼吸抵抗の変化の上でも、いわゆる late phase にあたる3-9時間にかけて遅発型反応(LAR)を示すものは1例も認められなかった。

2. 抗原暴露後の好酸球浸潤

抗原暴露後の好酸球浸潤の経時的推移を、large, intermediate, smallの各大きさの気管支別にFig. 5に示す。

large bronchus (Fig. 5-A)では、subepithelium領域の抗原暴露前が $71.8 \pm 23.1/\text{mm}^2$ 、抗原暴露6時間後が $8674.6 \pm 1475.2/\text{mm}^2$ 、epithelium領域の抗原暴露前が $136.6 \pm 35.1/\text{mm}^2$ 、暴露後6時間が $2496.9 \pm 361.1/\text{mm}^2$ と抗原暴露6時間目をピークに有意な増加が認められ、また、intermediate bronchus (Fig. 5-B)でも、subepithelium領域で暴露前が $379.3 \pm 75.2/\text{mm}^2$ 、暴露後6時間が $5744.4 \pm 782.9/\text{mm}^2$ 、epithelium領域で暴露前が $429.1 \pm 101.7/\text{mm}^2$ 、暴露後6時間が $2798.4 \pm 541.8/\text{mm}^2$ と共に抗原吸入暴露後6時間をピークに有意な増加が認められ、96時間後には、ほぼ暴露前のレベルにまで減少した。次に、small

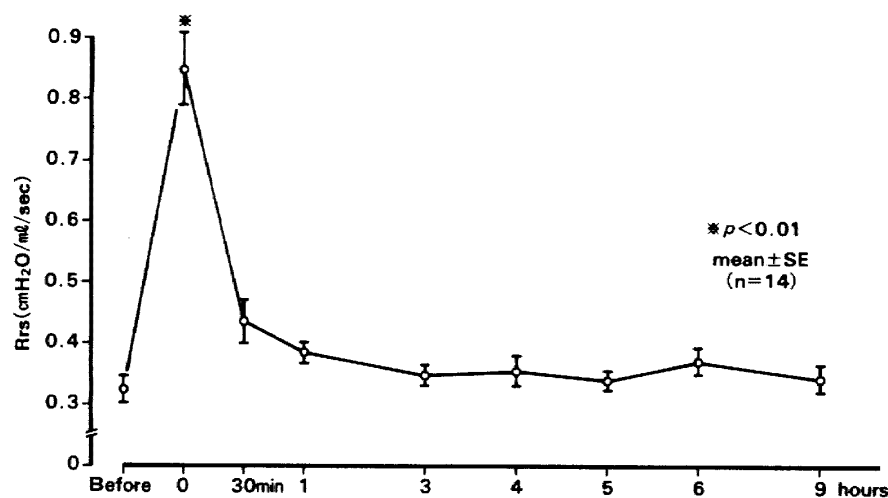


Fig. 4. Time-related change of the respiratory resistance in the passively sensitized guinea pigs after the antigen exposure.

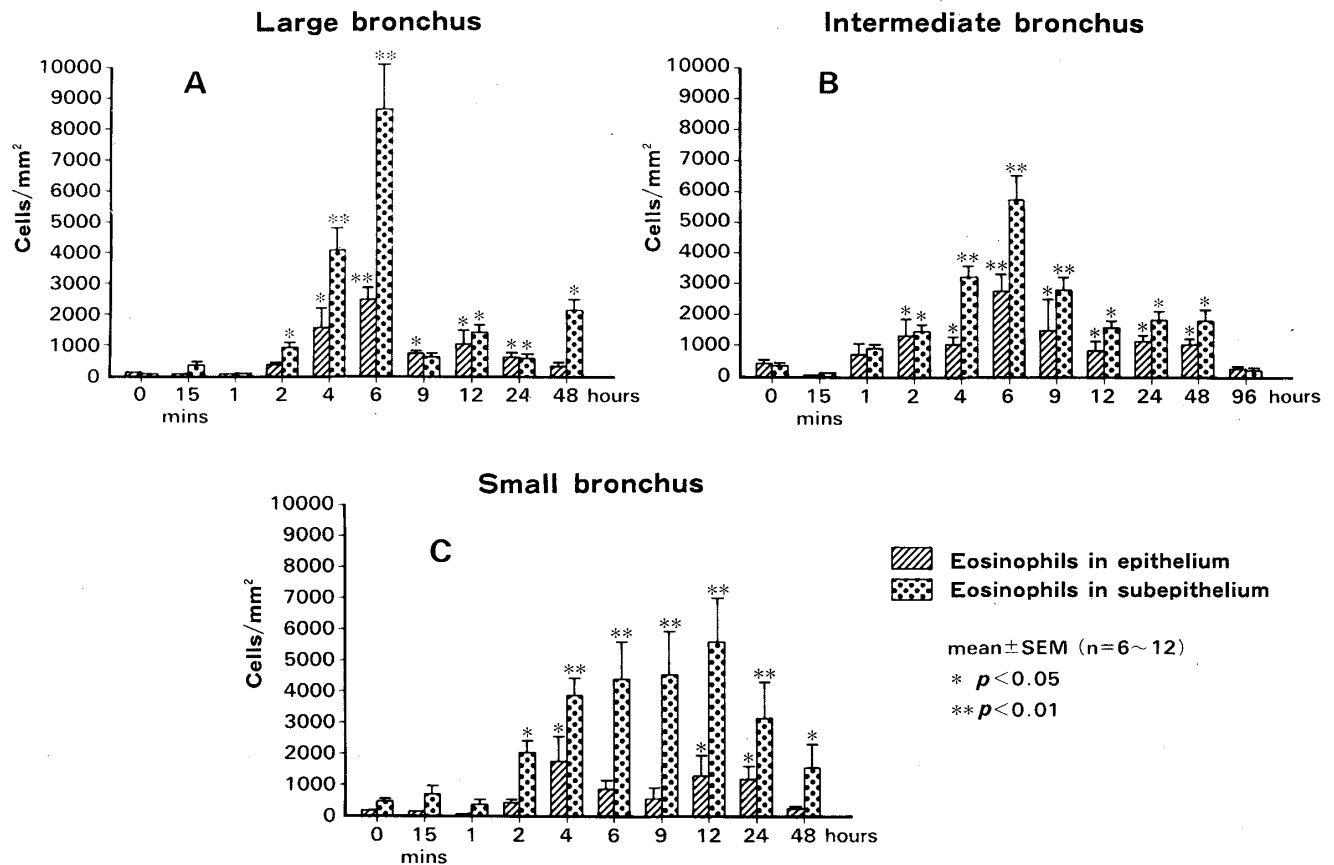


Fig. 5. Time-related change in the number of eosinophils in the large (A), intermediate (B) and small bronchi (C) of guinea pigs after challenge with OA.

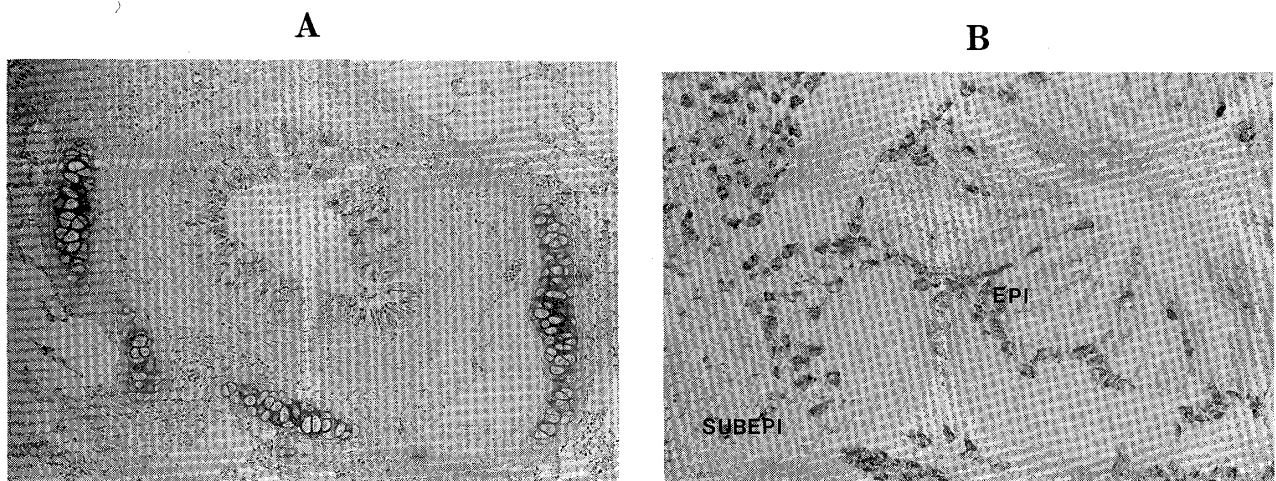


Fig. 6. Light micrographs of the bronchi stained with Giemsa before (A: $\times 100$) and 6 hrs after antigen exposure (B: $\times 200$). (B) Showing severe infiltration of eosinophils into the bronchus. EPI: Epithelium. SUBEPI: Subepithelium.

bronchus (Fig. 5-C)では、subepithelium領域で抗原暴露前が $486.0 \pm 52.2/\text{mm}^2$ 、暴露後12時間目が $5599.0 \pm 1418.4/\text{mm}^2$ と抗原暴露後12時間目をピークに有意な増加が認められ、large及びintermediate

bronchusの場合よりピークがやや遅れる傾向にあった。

抗原暴露前及び好酸球浸潤がピークであった暴露後6時間目の典型的な光顕肺組織写真を各々、Fig. 6-A

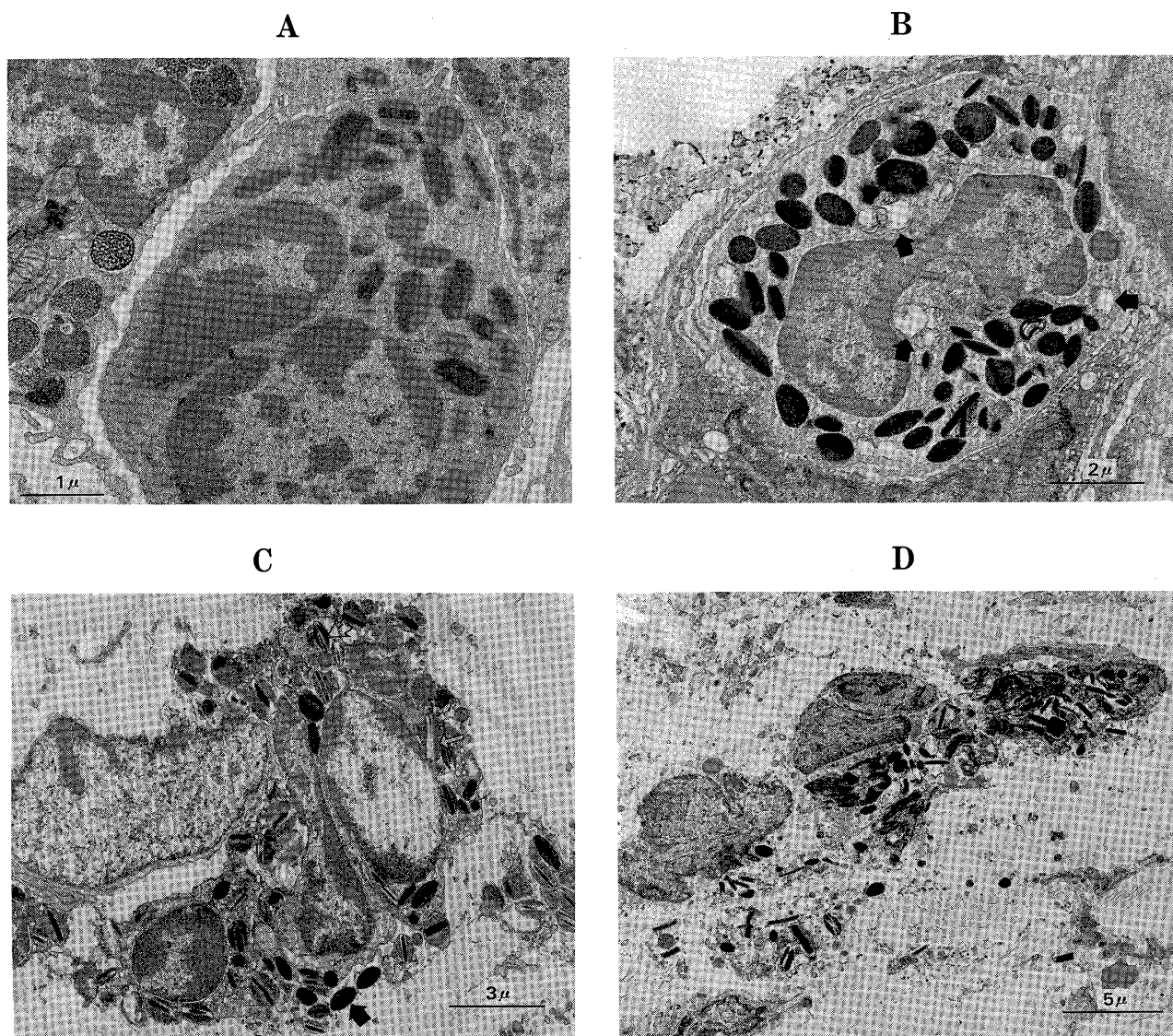


Fig. 7. Transmission electron photomicrographs of eosinophils in the lung tissues before (A), 6 hrs (B), 24 hrs (C) and 48 hrs (D) after antigen exposure.

(B): Arrows showing cytoplasmic vacuolation of a eosinophil leukocyte.

(C): Coarsening of specific granular matrix (◁), granular core lucency (⇐) and extrusion of membrane-bound specific granules (↔) were observed in majority of eosinophils.

(D): Complete disruptions in some of eosinophils were observed.

及び6-Bに示す。

3. 抗原暴露後の肺組織内好酸球及び気道上皮の超微細構造所見

Fig. 7に、各々抗原暴露前、後6時間、24時間、48時間目の気管支内に認められた好酸球のTEM写真を示す。

抗原暴露前 (Fig. 7-A) に比較し、暴露後6時間目 (Fig. 7-B) より細胞質の空胞化 (cytoplasmic vacuolation) が認められ、12時間後には気管支内に浸潤した多くの好酸球にその所見が顕著となり、更に24

時間後 (Fig. 7-C) には、好酸球内顆粒にも変化が認められ、特異顆粒 matrix の coarsening, core の lucency, また、一部特異顆粒そのものの extrusion が観察された。更に、48時間後 (Fig. 7-D) には、気管支内に浸潤した好酸球の中に著しく破壊されたものも多く認められた。

次に、Fig. 8に、各々抗原暴露前、後6時間、24時間目の気管支粘膜上皮のTEM写真を示す。

好酸球の浸潤がピークであった抗原暴露6時間目で、Goblet cell が顕著に認められるようになり、気管

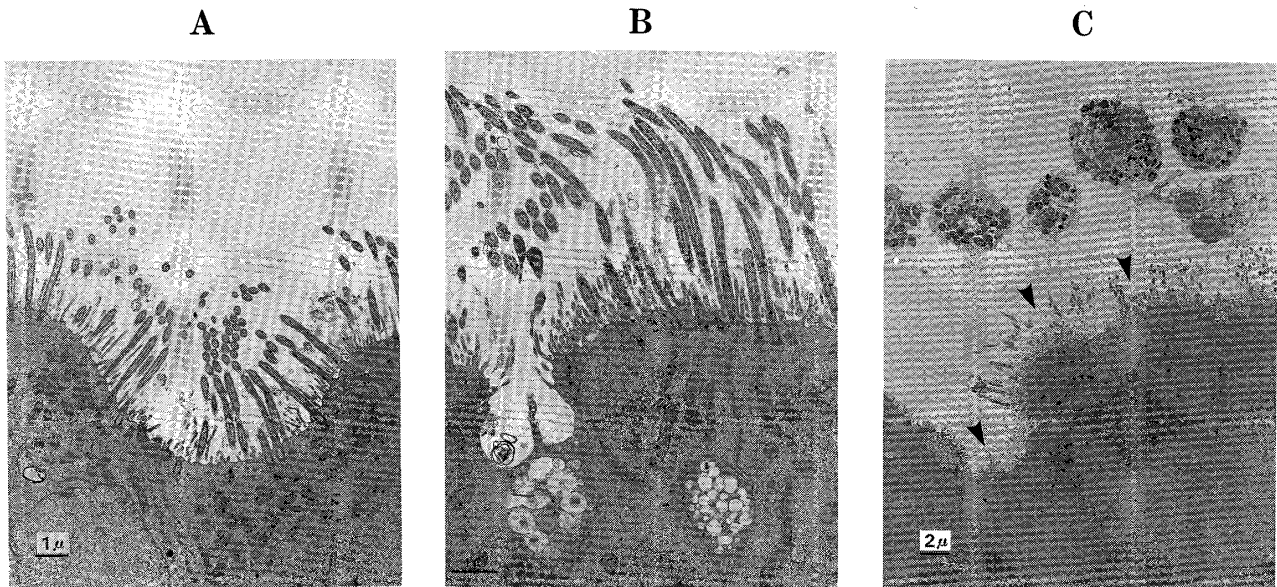


Fig. 8. Transmission electron photomicrographs of longitudinal sections of the bronchial cilia before (A), 6 hrs (B) and 24 hrs (C) after antigen exposure. (C): Arrowheads showing shedding and degeneration of the cilia.

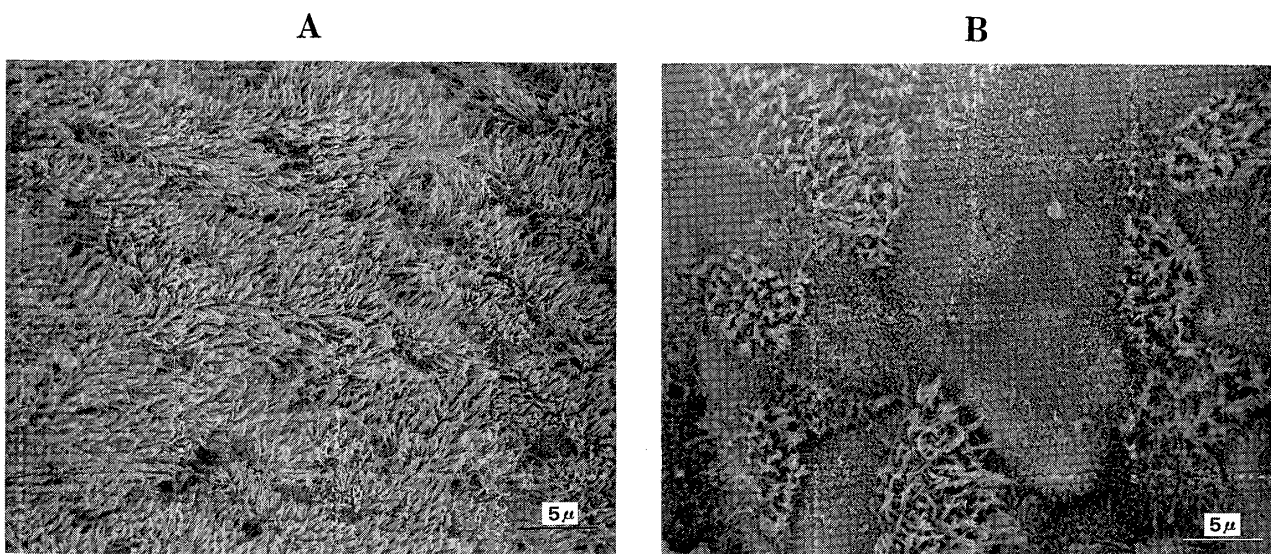


Fig. 9. Scanning electron photomicrographs of the airway epithelium before (A) and 24 hrs (B) after antigen exposure.

The damage of the cilia was observed in right photomicrograph (B).

支粘液分泌亢進状態が示唆されたが, cilia に関しては, 抗原暴露前 (Fig. 8-A) と同様ほぼ正常であった (Fig. 8-B). しかし, 抗原暴露24時間以後 (Fig. 8-C) において, 特に好酸球浸潤の著しい領域に一致して cilia の shedding, shortening, degeneration が観察された.

同様の所見は, SEM 上も観察された (Fig. 9-A, Fig. 9-B).

考 察

同種抗 OA 血清受身感作モルモットを用いて実験動物モデルにおける I 型アレルギー反応後の肺組織の好酸球浸潤を検討したところ, 気管支の epithelium, subepithelium 領域に, いわゆる “I 型反応後の late phase” にあたる抗原暴露 6 時間目に好酸球の有意な浸潤所見が認められ, 更に浸潤した好酸球の形態学的変化に伴い, その浸潤のピークを過ぎてから, 気管支

粘膜上皮 cilia に破壊性の変化が認められた。この結果は、アレルギー反応後の肺組織所見について継時的に検討され、アレルギー反応がもたらした好酸球浸潤と気道組織変化の関係を示唆した数少ない報告と考える。

これまでに、好酸球は、アナフィラキシー反応によって遊離された chemical mediator のいくつかを中和しないし不活化する酵素、例えば、histaminase¹⁴⁾, arylsulfatase¹⁵⁾, phospholipase D¹⁶⁾, lysophospholipase¹⁷⁾などを有することや、histamine release を抑制する、eosinophil-derived inhibitor (EDI)¹⁸⁾、それは後に PGE₁ や PGE₂ であることが確認¹⁹⁾を遊離すること、また、好酸球顆粒蛋白の 1 つである eosinophil peroxidase (EPO) が、H₂O₂ と halide の存在下で LTB₄, LTC₄, LTD₄ を不活化する²⁰⁾などの報告より、アレルギー反応における役割としては、I 型アレルギー反応を制御する可能性の立場が多くの研究者によって支持されてきた。しかし、最近、eosinophil から精製した arylsulfatase B (ASB) は、LTC が構造上 6 位の位置が tripeptide glutathione と thioether 結合になっているため、加水分解することが不可能である²¹⁾、phospholipase D は血小板融解作用をもつ因子は不活化するものの、PAF の不活化作用はない²²⁾、また、Gleich らの行ったウサギに作らせた抗モルモット好酸球抗体 (AES) をモルモットに注射し、好酸球を体内から除去した状態でも、PCA 反応、histamine release などの即時型反応は増強されない²³⁾など、I 型アレルギー反応（特に即時型相）の火消し役としての役割を疑問視している報告も多くみられている。

今回の我々の結果は、呼吸抵抗の有意な上昇など生理学的にも著しい発作が観察され、既に報告したように plasma histamine レベルもピークにあり²⁴⁾、即時型反応がまさに起こっている早期の時点では好酸球浸潤は全く認められず、遅発相の 6 時間をピークに気道への浸潤が認められたことは、即時型相での mediator を中和しないし不活化 (Zeiger らの histaminase による histamine の分解¹⁴⁾など) する為に好酸球浸潤が生じたことは示唆されにくく、この浸潤の時間的経過は、好酸球のアレルギー反応における役割を究明する上で極めて興味深い点である。

末梢血好酸球増多や組織内好酸球浸潤と遅発型喘息反応 (LAR) との関連を示唆した報告は、動物実験²⁵⁾²⁶⁾及びヒト喘息症例²⁷⁾³⁰⁾でなされている。滝島ら³¹⁾は、

モルモットをアスカリス抗原の腹腔内投与により能動的に感作し、ブースター免疫後抗原吸入暴露することにより LAR が認められたと報告している。

今回の抗 OA 血清受身感作モデルでは、好酸球浸潤のピークは遅発型反応相にあたる抗原暴露 6 時間後であったものの、その時間相にヒト喘息の LAR に相当するような呼気の再延長や呼吸抵抗の再上昇は一例も認められず、このような好酸球浸潤のみでは LAR は出現しえないことが示唆された。既に、我々は、感作方法を能動的に OA 反復吸入暴露を行うことによって、同様のモルモットの系で滝島らと同様 LAR が出現しうることを報告している³²⁾が、この場合の組織学的特徴としては、好酸球の浸潤に加えて著しい好中球の浸潤をも伴っていることであり、好中球浸潤の関与の重要性が示唆されている。これら感作方法の違い、homocytotropic antibody の差、慢性反復炎症による浸潤細胞の差 (好中球出現) などが、LAR 出現を決定する因子として重要であると考えられ、更に検討を要するものと考えている。

次に、好酸球内には多くの生理活性物質を保有することや、それらの物質を放出することが知られている。好酸球特異顆粒内の電子密度の高い crystalloid core の部分には、arginine に富んだ分子量約 9300 (モルモットは約 11000) の major basic protein (MBP) が存在している³³⁾が、この塩基性蛋白により、in vitro で寄生虫³⁴⁾のみならずモルモット³⁵⁾及びヒト気道粘膜組織³⁶⁾の破壊や、好塩基球や肥満細胞からの histamine release が導かれる³⁷⁾ことが報告され、また、特異顆粒の core を取り囲む matrix にも、組織障害性のある eosinophil peroxidase (EPO)³⁸⁾、eosinophil cationic protein (ECP)³⁹⁾が存在することが知られ、肥満細胞からの histamine 遊離作用も報告されている⁴⁰⁾。更に、好酸球から多量の LTC₄ (好中球に比べ 5 倍強)⁴¹⁾⁴³⁾や PAF⁴⁴⁾が産生されることも報告されている。

今回の実験では、これらの生理活性物質は測定しておらず、アレルギー反応後これらが放出されるような好酸球の活性化が生じているかは不明である。しかし、気管支壁に浸潤した好酸球の超微細所見、すなわち特異顆粒 core の lucency, matrix の coasening, 特異顆粒そのものの extrusion などの経時的変化は、MBP, ECP, EPO などの細胞外への放出を形態学的に示唆するものである。経時的観察ではないが、須藤⁴⁾も喘息症例の気管支壁に浸潤している好酸球の形態学的観察を行い、特異顆粒の core の融解, matrix 構造の崩壊を報

告している。また、アレルギー反応による好酸球活性化の可能性は、抗原吸入誘発試験後に ECP の血清レベルが増加する²⁸⁾⁴⁵⁾、末梢好酸球が低比重化する⁴⁶⁾、ブタクサ花粉症患者の末梢血好酸球の chemiluminescence 能がシーズン中のみ亢進する⁴⁷⁾などの報告により支持されており、我々のアレルギー実験モデルにおいても類似の活性化が生じている可能性が考えられる。

気道粘膜上皮 cilia の傷害が、好酸球の浸潤がピークであった抗原暴露後 6 時間目ではなく、24 時間目以後の一定の潜伏時間後にみられたということは、in vitro で MBP によりモルモット気道上皮が破壊されるのに一定の incubation time (MBP の濃度にもよるが数時間-24 時間以上)が必要であるという Gleich ら³⁵⁾の報告と矛盾するものでなく、アレルギー反応→気道粘膜組織への好酸球浸潤→好酸球からの MBP, ECP, EPO などの生理活性物質の放出→気道粘膜上皮の傷害という一連の経過の可能性を示唆するものである。

なお、今回の実験結果より観察された組織所見と好酸球との関連をさらに明確にするためには、好酸球を除去した条件での組織学的観察が必要であると思われる。

結 語

同種抗 OA 血清による受身感作モルモットを用いて抗原を吸入暴露し、I 型アレルギー反応後の気管支好酸球浸潤と形態学的変化について経時的に検討した。

1. 抗原暴露後の好酸球浸潤は、large (直径 0.5mm 以上) 及び intermediate bronchus (直径 0.2mm 前後) では、6 時間後にそのピークが認められ、small bronchus (直径 0.1mm 前後) では、12 時間目であった。

2. 抗原暴露後の気管支内好酸球の超微細構造を経時的に観察したところ、6 時間後より細胞質の空胞化が、24 時間後には特異顆粒 matrix の coarsening, core の lucency, 特異顆粒そのものの extrusion が、更に 48 時間後には著しく破壊された好酸球が観察された。

3. 抗原暴露後の気管支粘膜上皮の超微細構造は、好酸球浸潤のピークであった 6 時間目では cilia に殆ど変化がなく、24 時間以後に破壊性変化が認められた。

本研究の一部は、文部省科学研究費 No. 60304059 によるものである。

本研究の実施にあたって、御協力頂きました獨協医科大学総研電顕室山口恵一郎氏、同大形態研究室湯沢久子さん、同大アレルギー内科柿沼陽子さん、町田はるみさん、加藤典子さんに感謝するとともに、医局の諸先生方にも御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 35 回 (前橋, 1985)・第 36 回 (岐阜, 1986) 日本アレルギー学会総会、第 26 回日本胸部疾患学会総会 (福岡, 1986) において発表した。

文 献

- 1) Dunnill, M.S.: The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J. Clin. Pathol.* 13, 27-33, 1960.
- 2) Gough, J.: Post mortem differences in "asthma" and in chronic bronchitis. *Acta. Allergol.* 16, 391-399, 1961.
- 3) 無江昭子: 気管支喘息の病理形態像。アレルギー 20, 885-902, 1971.
- 4) 須藤守夫: 気管支喘息における好酸球、組織肥満細胞について。臨床免疫 6, 773-781, 1974.
- 5) Callera, M.L., Condemni, J.J., Bohrod, M.G. and Vaughan, J.H.: Immunologic reactions of bronchial tissues in asthma. *N. Engl. J. Med.* 284, 459-464, 1971.
- 6) 夏井坂徹, 岡本賢三, 小場弘之, 田垣 茂, 菅原好孝, 鈴木 明, 神谷美保: 気管支喘息の内視鏡的及び組織学的検討一発作の程度との関連性について。気管支学 3, 407-411, 1981.
- 7) 谷崎勝朗, 原田 寛, 小橋秀敏, 塩田雄太郎, 竹山博泰, 中村之信, 多田慎也, 木村郁郎: 気管支喘息における肺の細胞反応を中心とした組織学的変化について—TBLB による検討—。アレルギー 32, 229-236, 1983.
- 8) Godard, P., Chaintreuil, J., Damon, M., Coupe, M., Flandre, O., Crastes, P.A. and Michel, F.B.: Functional assessment of alveolar macrophages: Comparison of cells from asthmatics and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70, 88-93, 1982.
- 9) Metzger, W.J., Nugen, K., Richerson, H.B., Moseley, P., Lakin, R., Zavala, D. and Hunninghake, G.W.: Methods for bronchoalveolar lavage in asthmatic patients following bronchoprovocation and local antigen challenge. *Chest* 87(Suppl 1), 16s-19s, 1985.
- 10) Yukawa, T., Makino, S., Fukuda, T. and Kamikawa, Y.: Experimental model of anaphylaxis-induced beta adrenergic blockade in the airways. *Ann. Allergy* 57, 219-224, 1986.

- 11) Ovary, Z.: Passive cutaneous anaphylaxis. In "Immunological Methods" 1st Ed. (ed. by J.D. Ackroyd), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp.259-283, 1964.
- 12) Mead, J.: Control of respiratory frequency. *J. Appl. Physiol.* 15, 325-336, 1960.
- 13) Walter, R.J. and Berns, M.W.: Computer-enhanced video microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6927-6931, 1981.
- 14) Zeiger, R.S. and Colten, H.R.: Histaminase release from human eosinophils. *J. Immunol.* 118, 540-543, 1977.
- 15) Wasserman, S.I., Goetzl, E.J. and Austen, K.F.: Inactivation of slow reacting substance of anaphylaxis by human eosinophil arylsulfatase. *J. Immunol.* 114, 645-649, 1975.
- 16) Kater, L.A., Goetzl, E.J. and Austen, K.F.: Isolation of human eosinophil phospholipase D. *J. Clin. Invest.* 57, 1173-1180, 1976.
- 17) Weller, P.F., Wasserman, S.I. and Austen, K.F.: Selected enzymes preferentially present in the eosinophil. In "The Eosinophil in Health and Disease" (ed. by A.A.F. Mahnond, and K.F. Austen), Grune & Stratton, New York, pp.115-130, 1980.
- 18) Hubscher, T.: Role of the eosinophil in the allergic reactions. I. EDI-an eosinophil-derived inhibitor of histamine release. *J. Immunol.* 114, 1379-1388, 1975.
- 19) Hubscher, T.: Role of the eosinophil in the allergic reactions. II. Release of prostaglandins from human eosinophilic leukocytes. *J. Immunol.* 114, 1389-1393, 1975.
- 20) Henderson, W.R., Jorg, A. and Klebanoff, S.J.: Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B, C and D. *J. Immunol.* 128, 2609-2613, 1982.
- 21) Weller, P.F.: Functional and biochemical properties of selected protein constituents of human eosinophils. In "Immunobiology of the Eosinophil" (ed. by T. Yoshida and M. Torisu), Elsevier Biomedical, New York, pp.145-161, 1983.
- 22) Valone, F.H., Whitmer, D.I., Pickett, W.C., Austen, K.F. and Goetzl, E.J.: The immunological generation of a platelet-activating factor and a platelet-lytic factor in the rat. *Immunology* 37, 841-848, 1979.
- 23) Gleich, G.J., Olson, G.M. and Loegering, D.A.: The effect of ablation of eosinophils on immediate-type hypersensitivity reactions. *Immunology* 38, 343-353, 1979.
- 24) 湯川龍雄, 福田 健, 本島新司, 池森亨介, 牧野莊平, 和久茂仁, 山口恵一郎, 名加富紫生, 細野克彦, 副島和彦: アナフィラキシー反応がモルモット肺組織所見に及ぼす影響について (第1報). *アレルギー* 34, 748-748(抄録), 1985.
- 25) Abraham, W.M., Delehunt, J.C., Yerger, L. and Marchette, B.: Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 839-844, 1983.
- 26) Delehunt, J.C., Perruchoud, A.P., Yerger, L., Marchette, B., Stevenson, J.S. and Abraham, W.M.: The role of slow reacting substance of anaphylaxis in the late bronchial response after antigen challenge in allergic sheep. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130, 748-754, 1984.
- 27) 會田秀介, 池田千鶴, 成松 博, 野口 久, 横川敏男, 中島宏昭, 井出宏嗣, 杉崎徹三, 高橋昭三: 気管支喘息患者における経気管支内視鏡の室内塵抗原滴下による内視鏡のおよび組織学的研究. *アレルギー* 32, 274-281, 1984.
- 28) de Monchy, J.G.R., Kauffman, H.F., Venge, P., Koeter, G.H., Jansen, H.M., Sluiter, H.J. and Vries, K.D.: Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 131, 373-376, 1985.
- 29) Booij-Noord, H., de Vries, K., Sluiter, H.J. and Orie, N.G.M.: Late bronchial obstructive reaction to experimental inhalation of house dust extract. *Clin. Allergy* 2, 43-61, 1972.
- 30) Durham, S.R. and Kay, A.B.: Eosinophils, bronchial hyper-reactivity and late-phase asthmatic reactions. *Clin. Allergy* 15, 411-418, 1985.
- 31) Takishima, T., Yamauchi, K., Ishii, M., Chao, C.L., Iijima, H., Shimura, S., Shindo, Y., Inoue, H. and Mue, S.: Late pulmonary response in guinea pigs after ascaris challenge. *Tohoku J. Exp. Med.* 146, 121-122, 1985.
- 32) 湯川龍雄, 福田 健, 牧野莊平: アレルギーの実験モデル 1. 実験的喘息-モルモットにおける-. *アレルギー* 35, 627-627(抄録), 1986.
- 33) Lewis, D.M., Lewis, J.C., Loegering, D.A. and Gleich, G.J.: Localization of the guinea pig eosinophil major basic protein to the core of the granule. *J. Cell. Biol.* 77, 702-713, 1978.
- 34) Butterworth, A.E., Wasson, D.L., Gleich, G.J., Loegering, D.A. and David, J.R.: Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immunol.* 122, 221-229, 1979.
- 35) Frigas, E., Loegering, D.A. and Gleich, G.: Cytotoxic effects of the guinea pig eosinophil major basic protein on tracheal epithelium. *Lab. Invest.* 42, 35-43, 1980.
- 36) Frigas, E., Loegering, D.A., Solley, S.O., Farrow, G.M. and Gleich, G.J.: Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma.

- Mayo Clin. Proc.* 56, 345-353, 1981.
- 37) O'Donnell, M.C., Ackerman, S.J., Gleich, G.J. and Thomas, L.L.: Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *J. Exp. Med.* 157, 1981-1991, 1983.
 - 38) Jong, E.C., Mahmond, A.A.F. and Klebanoff, S. J.: Peroxidase mediated toxicity to schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 126, 468-471, 1981.
 - 39) McLare, D.J., McKean, J.R., Olsson, I., Venge, P. and Kay, A.B.: Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro. *Parasite Immunol.* 3, 359-373, 1981.
 - 40) Henderson, W.R., Chi, E.Y. and Klebanoff, S.J.: Eosinophil peroxidase-induced mast cell secretion. *J. Exp. Med.* 152, 265-279, 1980.
 - 41) Weller, P.F., Lee, C.W., Foster, D.W., Corey, E. J., Austen, K.F. and Lewis, R.A.: Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotrienes by human eosinophils: Predominant productin of leukotriene C₄. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7626-7630, 1983.
 - 42) Shaw, R.J., Cromwell, O. and Kay, A.B.: Preferential generation of leukotriene C₄ by human eosinophils. *Clin. Exp. Immunol.* 56, 716-722, 1984.
 - 43) Shaw, R.J., Walsh, G.M., Cromwell, O., Moqbel, R., Spry, C.J.F. and Kay, A.B.: Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes. *Nature* 316, 150-152, 1985.
 - 44) Lee, T.C., Leniham, D.J., Malone, B., Roddy, L. L. and Wasserman, S.I.: Increase biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J. Biol. Chem.* 259, 5526-5530, 1984.
 - 45) Dahl, R., Venge, P. and Olsson, I.: Variations of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma. *Allergy* 33, 211-215, 1978.
 - 46) 須甲松信, 油井泰雄, 信太隆夫: 喘息患者末梢血好酸球のheterogeneity 第2報 好酸球の活性化について, 日胸疾誌 23(増刊号), 171-171(抄録), 1985.
 - 47) Shult, P.A., Graziano, F.M. and Busse, W.W.: Enhanced eosinophil Lumonol-dependent chemiluminescence in allergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 77, 702-708, 1986.

HISTOLOGIC STUDIES ON GUINEA PIG BRONCHI FOLLOWING INHALED ANTIGEN EXPOSURE

I. Single Antigen Challenge-Induced Eosinophilic Infiltration and Epithelial Damage in Passively Sensitized Models

Tatsuo Yukawa, Yoshinori Terashi, Takeshi Fukuda and Sohei Makino

Department of Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

Katsuhiko Hosono and Kazuhiko Soejima

First Department of Pathology, School of Medicine, Showa University

The influence of a single inhaled antigen challenge on the infiltration of eosinophils and morphological changes in the bronchial tissues was examined in guinea pigs passively sensitized with intravenous injections of anti-ovalbumin (OA) serum.

In light microscopic examination, the peak of eosinophilic infiltration in both the epithelium and subepithelium of the bronchi was observed at 6 hours after the antigen exposure. In ultrastructural examination, the majority of eosinophils in the bronchi showed cytoplasmic vacuolation, coarsening of the granular materix and granular core lucency. Some eosinophils were completely disrupted long after the peak of the infiltration. Concerning the airway epithelium, varying degrees of damage to the cilia, which seemed to be related to the migration of eosinophils and the time interval of exposure to the antigen, were observed.

These findings suggest that the eosinophils migrated in the bronchi might involved in the deleterious role in the pathophysiology of asthma.